动 物 学 研 究 2005, Feb. 26 (1): 101-105 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

桃蚜高效氯氰菊酯抗性选育过程中酯酶含量和活性变化

帅 霞, 王进军*
(西南农业大学 植物保护学院, 昆虫学及害虫控制工程重庆市重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 采用生物测定和微量滴度酶标板法监测了桃蚜对高效氯氰菊酯抗性的发展趋势。结果表明, 随着筛选次数增加, 桃蚜对高效氯氰菊酯的抗药性逐渐增强: 筛选3代后相对抗性倍数为13.00, 10代后为49.86倍。随着抗性增强, 桃蚜酯酶酶源蛋白含量从35.8632增加到66.2990 μg/mL, 酯酶活性从33.6760增加到171.0052 μmol/ (mL·min)。比较抗性发展过程中酯酶酶源蛋白含量及其活性个体频率分布结果发现, 随着选育次数的增多, 更多的桃蚜个体分布在酯酶酶源蛋白含量和酯酶活性高的区域。相关分析结果表明, 抗性筛选过程中的 LD_{50} 与酯酶含量及活性变化之间呈显著正相关, 酯酶在桃蚜对高效氯氰菊酯抗药性发展中可能起着十分重要的作用。

关键词: 桃蚜; 高效氯氰菊酯; 抗药性; 酯酶; 酶标仪
中图分类号: Q969.367.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2005)01-0101-05

Change in Esterase Activity and Content During the Selection of Resistance to Alphamethrin in *Myzus persicae*

SHUAI Xia, WANG Jin-jun*
(*College of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing* 400716, *China*)

Abstract: The resistance of alphamethrin in *Myzus persicae* (green peach aphid) was selected in laboratory. The resistance development was monitored through the bioassay and the 96-well microplate reader for measuring change of esterase (Est). The results showed that the resistance level gradually rose with the increase of selection time. After three generations, the resistance of green peach aphid was 13-fold. While ten generations later, the resistance amounted to 49.86-fold. It suggested that green peach aphid developed obvious resistance to alphamethrin. As resistance developed, enzyme protein content increased significantly from 35.8632 to 66.2990 μg/mL with Est activity varying from 33.6760 to 171.0052 μmol/ (mL·min). Comparing the frequency distribution of enzyme protein content and activity, we found that more and more individuals possessed higher content and activity. And there is a significant correlation between LD_{50} and enzyme protein content, Est activity respectively. The results showed that the Est played an important role in resistance development of green peach aphid to alphamethrin.

Key words: *Myzus persicae*; Alphamethrin; Resistance; Esterase; Microplate reader

桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 是一种世界性的害虫, 其世代短、繁殖快、发生面广、食性杂, 除直接取食危害寄主外还传播多种病毒病 (Liu et al, 1999)。由于化学农药的大量使用, 很多地区蔬菜、果树上的桃蚜的抗药性迅速增强, 致使许多老品种杀虫剂无法使用。当其用量低时, 对蚜虫的防治效果不理想; 用量高时, 在作物上的残留又太重, 对蚜虫天敌的杀伤力也太大。已有31个国家报道桃蚜产生了抗药性, 至少涉及69种杀虫剂 (Georghiou, 1981)。高效氯氰菊酯是氯氰菊酯的高效异构体, 具有高效、低毒等特性, 是防治蚜虫的常用杀虫剂。但已有的研究表明桃蚜容易对其产生抗性

收稿日期: 2004-08-27; 接受日期: 2004-12-07
基金项目: 国家自然科学基金 (30170617); 霍英东青年教师基金 (71022); 重庆市骨干教师计划资助项目
* 通讯作者 (Corresponding author), 王进军 (1970-), 男, 博士, 教授; 主要从事昆虫分子生态及毒理研究。Tel: 023-68251795 (805), E-mail: jjwang7008@yahoo.com

(Moores, 1982)。

酯酶是昆虫体内的重要解毒酶之一，其活性改变与许多昆虫的抗性有关（Kao et al, 1985)。桃蚜体内酯酶活性增强是其对多种杀虫剂产生抗性的主要机理（Devonshire et al, 1998)。通过对增效剂的研究也表明，桃蚜对氰戊菊酯的抗性增强与其体内酯酶活性增加有关（Chen & Luo, 1994)。因此有学者提出通过检测酯酶活性的变化来监测昆虫的抗药性（Gao et al, 1998)。在检测酯酶活性的方法中，微量滴度酶标板法具有简捷、快速、可测定出单头酶活性等优点。因而我们在对桃蚜进行高效氯氰菊酯抗性选育的过程中，在酯酶活性与抗性发展最为相关的早期，运用酶标仪测定其体内酯酶含量及活性变化的频率分布。旨在快速准确地监测室内桃蚜种群抗性的发展动态及抗性基因频率分布情况，为抗性预测、合理使用杀虫剂及抗性治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

相对敏感种群：于2003年9月采自重庆市北碚区蔬菜地，带回室内接种在萝卜苗上饲养繁殖。饲养条件为：温度（25±1)℃，光照周期L:D=16:8 h，相对湿度70%～80%。

相对抗性种群：将4.5%高效氯氰菊酯乳油以杀死种群70%～80%的剂量（约0.0216 mmol/L）配好后，用手持喷雾器将药液均匀喷洒于饲养有相对敏感种群的萝卜苗上，以药剂湿润叶面又不流失为度。喷药24 h后，将存活蚜虫转移到新萝卜苗上，产蚜1～2 d后再移走受药成虫，待同一代蚜虫在室内发育成新的成熟个体时再一次喷药。用药几代后，为保证70%～80%的选择压力，适当提高用药浓度。经多代筛选后即获得抗性品系。起始代用F_0表示；药剂筛选后第1、2、…n代，分别以F_1、F_2、…F_n表示。

1.2 主要试剂及仪器

92.9%高效氯氰菊酯（alphamethrin）原药（海宁化工）用于生物测定实验；4.5%高效氯氰菊酯（alphamethrin）乳油（江苏扬农化工集团有限公司）用于抗性筛选。其他试剂有：α-萘酚（中国医药上海化学试剂公司)、乙酸-α-萘酯（α-NA，中国上海青浦合成试剂厂)、固蓝B盐（进口分装，上海化学试剂公司)、十二烷基硫酸钠（SDS，上海生工生物有限公司)、考马斯亮蓝G-250（Fluka公司)。酶标仪（Microplate reader）为奥地利TECAN公司生产。

1.3 生物测定

参照Han & Wang（1994）的方法，把92.9%的高效氯氰菊酯用丙酮稀释成5个浓度梯度，用微量点滴器将各浓度药液0.034 μL点滴在无翅成蚜腹部，每个浓度处理30头，重复3次，用丙酮作对照。处理后的蚜虫放进指形管内置于25℃下，5 h后检查死亡头数。用小毛笔拨动虫体，附肢不能正常伸展活动的个体判定为死亡。对照死亡率控制在10%以内，各处理的死亡率用Abbott公式校正。根据剂量对数值和校正死亡率的几率值，拟合毒力回归方程（LD-p）并计算致死中量（LD_{50})。

1.4 酯酶活性测定

参照Abdel-Aal et al（1992）的方法，并略有改进。取单头无翅成蚜，用0.5 mL磷酸缓冲液（0.02 mol/L，pH 7.0）冰浴匀浆，匀浆液于4℃、10 000 r/min下离心10 min，上清液作为酶源。取100 μL 0.3 mmol/L α-NA加到酶标板孔中，然后加入75 μL酶液，于30℃下反应10 min，再加入25 μL DBLS试剂（1%固兰B盐：5% SDS=2:5，V:V）终止反应。10min后于600 nm下测OD值，在标准曲线上计算产物生成量。各处理重复100次以上。

1.5 蛋白质含量测定

参照Abdel-Aal et al（1990）的方法，取200 μL 0.0025%考马斯亮兰G-250溶液于酶标板孔内，再加入50 μL酶液，于25℃下反应10 min，595 nm处测OD值。以牛血清白蛋白作标准曲线。

每次药剂筛选1周后进行生物测定、酶活性和蛋白含量的测定。用SPSS统计软件分析生物测定获得的结果分别与酶活性和蛋白质含量的相关性。

2 结果与分析

2.1 抗高效氯氰菊酯品系的选育结果

抗性筛选的生物测定结果见表1。药剂处理3代后抗性倍数就达13倍，说明桃蚜产生了明显的抗性。随着选育代数增加，抗性倍数逐渐增强。F_3～F_5代抗性上升缓慢，平均每代上升1.28倍；F_5～F_{10}代抗性发展快速，平均每代上升6.86倍，尤其是F_8～F_{10}代，平均每代上升10.86倍。抗性筛选过程中，LD-p回归方程的斜率有变小的趋势，

表明桃蚜群体中抗性个体不稳定，群体发生了异质性变化，抗性倍数有进一步增加的潜力。

2.2 抗性筛选过程中酯酶含量和活性的变化

随着抗性选育代数增加，桃蚜酯酶酶源蛋白含量和酯酶活性上升（表2）。$F_0 \sim F_5$ 代酯酶蛋白含量有增加，但代间无显著差异；$F_5 \sim F_9$ 代显著提高；$F_9 \sim F_{10}$代间增幅又减慢，无显著差异。$F_0 \sim F_5$ 代桃蚜酯酶活性几乎呈直线增长，代间差异显著；F_5 与 F_8 代间活性增长较慢，无显著差异；$F_8 \sim F_{10}$ 上升速率加快，有显著差异。

经相关分析，各抗性选育代数的 LD_{50}与酯酶酶源蛋白含量和酯酶活性相关系数分别为 0.933 和 0.931，由此可见酯酶在桃蚜对高效氯氰菊酯的抗性发展中可能起着十分重要的作用。

表1 抗高效氯氰菊酯品系的选育结果

Tab.1 Resistance selection of *Myzus persicae* to alphamethrin

选育代数 Number of generation selected	回归方程 LD-p equation	$LD_{50} \pm SE$ (μg/insect)	R	χ^2	相对抗性倍数 Relative resistance factor
F_0	$y = 12.0585 + 1.6878x$	0.00007 ± 0.00001	0.9827	3.6186*	1.00
F_3	$y = 10.6354 + 1.8540x$	0.00091 ± 0.00014	0.9751	4.2391*	13.00
F_5	$y = 8.6782 + 1.2422x$	0.00109 ± 0.00027	0.9926	0.9896*	15.57
F_8	$y = 8.9518 + 1.4605x$	0.00197 ± 0.00039	0.9817	3.2480*	28.14
F_9	$y = 8.1358 + 1.2070x$	0.00252 ± 0.00059	0.9943	0.7437*	36.00
F_{10}	$y = 8.5871 + 1.4597x$	0.00349 ± 0.00073	0.9953	0.8068*	49.86

* χ^2 适合性检验理论值与实测值差异不显著。

* χ^2 goodness-of-fit test showed there is no significant difference between theoretical and observed values.

表2 桃蚜高效氯氰菊酯抗性选育过程中酶蛋白和酯酶活性的变化

Tab.2 Change of esterase activity and enzyme protein contents in *Myzus persicae* during the selection of resistance to alphamethrin

选育代数 Number of generation selected	酶蛋白含量 Content of enzyme protein (μg/mL)	酶蛋白含量比 Ratio of enzyme protein content	酯酶活性 Activity of esterase [μmol/ (mL·min)]	酯酶活性比 Ratio of esterase activity
F_0	35.8632 ± 0.9484^a	1.00	33.6760 ± 1.1646^a	1.00
F_3	39.0649 ± 1.2031^a	1.09	85.5783 ± 2.7921^b	2.54
F_5	39.5816 ± 1.0292^a	1.10	123.8894 ± 2.8252^c	3.68
F_8	46.3895 ± 1.6202^b	1.29	124.6811 ± 4.0702^c	3.70
F_9	65.5525 ± 1.9137^c	1.83	160.8691 ± 3.7938^d	4.78
F_{10}	66.2990 ± 1.7878^c	1.85	171.0052 ± 3.9568^e	5.08

表中同一列不同上标字母表示两者之间差异显著（LSD 多重比较，$P < 0.05$）。

Data in the same column followed by different letters mean significant differenc (LSD multiple range test, $P < 0.05$).

2.3 抗性选育过程中酯酶酶源蛋白含量和酯酶活性的个体频率分布比较

抗性筛选过程中桃蚜酯酶酶源蛋白含量和活性的频率分布见图1和图2。结果显示，随着抗性选育代数增加，酯酶酶源蛋白含量在 0～50 μg/mL 的个体频率逐渐减少，由敏感品系（F_0）的 85.84% 减少到F_{10}的 22.73%；含量在 50～100 μg/mL、100～150 μg/mL 间的个体频率逐渐增加，分别由 13.70%增加到 71.82%、0.46%增加到 5.45%。在抗性筛选过程中桃蚜酯酶活性个体频率分布变化与蛋白含量变化相似，活性在 0～100 μmol/（mL·min）间的个体频率逐渐减少，由敏感品系的 98.63%减少到 F_{10}的 5.41%，活性在 100～200 μmol/（mL·min）、200～300 μmol/（mL·min）间的个体频率逐渐增加，分别由 1.37% 增加到 71.17%、0 增加到 23.43%。说明随着抗性的发展，更多的桃蚜个体向酯酶酶源蛋白含量和酯酶活性高的区域分布。

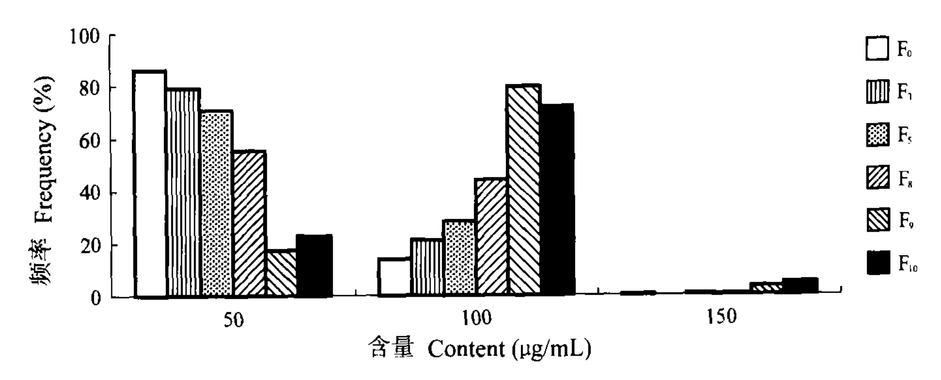


图 1 桃蚜高效氯氰菊酯抗性选育过程中酶蛋白含量个体频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of individual enzyme protein content in *Myzus persicae* during the selection of resistance to alphamethrin

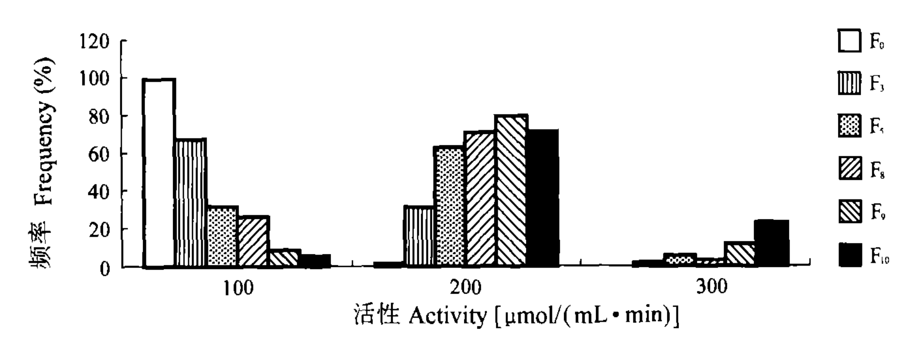


图 2 桃蚜高效氯氰菊酯抗性选育过程中酯酶活性个体频率分布

Fig. 2 Frenquency distribution of individual esterase activity in *Myzus persicae* during the selection of resistance to alphamethrin

3 讨 论

抗药性问题是害虫综合治理中最重要的问题之一 (Yang et al, 2001)。许多昆虫的抗性程度与酯酶的活性具有正相关。如：在褐飞虱对甲胺磷抗性筛选过程中的酯酶活性变化与 LD_{50}变化存在很高的正相关性 (Liu et al, 2002)；用微量滴度酶标板法测定北京棉蚜与高密棉蚜的酯酶活性频率分布的结果表明，抗性较高的高密种群酯酶活力高的个体比抗性较低的北京种群多 (Xie et al, 2002)。本研究亦证实了桃蚜对高效氯氰菊酯抗性发展过程中其酯酶活性和抗性指数 (LD_{50}) 之间呈正相关。当然昆虫抗性和敏感个体酯酶活性的差异可以是量的差异，也可以是质 (酯酶发生变构等) 的差异，或两者兼有 (Tang, 1993)。我们认为，桃蚜在对高效氯氰菊酯产生抗性过程中酯酶活性增强是酯酶酶量增加的结果，是否发生结构变异有待进一步研究。

参考文献：

Abdel-Aal YAI, Lampert EP, Roe RM, Semtner PJ. 1992. Diagnostic esterases and insecticide resistance in the tobacco aphid, *Myzus nicotianae* Blackman (Homoptera: Aphididae) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **43**: 123 - 133.

Abdel-Aal YAI, Wolff MA, Roe RM, Lampert EP. 1990. Aphid carboxylesterases: Biochemical aspects and importance in the diagnosis of insecticide resistance [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **38**: 255 - 266.

Chen NC, Luo JT. 1994. The effects of mixtures of phoxim (or dimethoate) and fenvalerate on resistant evolution in green peach aphids [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, **21** (3): 269 - 274. [陈年春，罗记台. 1994. 辛氰和乐氰混剂对甘蓝桃蚜抗性演化的影响. 植物保护学报，21 (3): 269 - 274.]

Devonshire AL, Field LM, Foster SP. 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society London*, **353**: 1677 - 1684.

Gao XW, Hu MH, Zheng BZ. 1998. Monitoring *Aphis gossypii* Glover resistance to insecticides using kinetic measuring method of carboxylesterase activity [J]. *Entomological Knowledge*, **35** (1): 17

-19.［高希武，胡煜华，郑炳宗. 1998. 运用酶标仪动力学方法监测棉蚜的抗药性. 昆虫知识，**35**（1）：17-19.］

Geoghiou GP. 1981. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods, an index of cases reported through 1980［M］. FAO Plant Production and Protection Series, Rome. 192.

Han ZJ, Wang YC. 1994. A simple method for detection insecticide resistances in cotton aphid（*Aphis gossypii* Glover）［J］. *Journal of Nanjing Agricultural University*, **17**（2）：28-32.［韩召军，王荫长. 1994. 棉蚜抗药性简易生物测定技术研究. 南京农业大学学报，**17**（2）：28-32.］

Kao LR, Motoyama N, Dauterman WC. 1985. The purification and characterization of esterase from insecticide resistance and susceptible house flies［J］. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **23**: 228-239.

Liu YG, Xu XH, Zhao B, Yu JC. 1999. Preliminary studies on the insecticidal resistance of *Myzus persicae* in the Harbin area［J］. *Journal of Northeast Agricultural University*, **30**（4）：329-333.［刘亚光，许修宏，赵　滨，于久才. 1999. 哈尔滨市地区蚜虫抗药性的初步研究. 东北农业大学学报，**30**（4）：329-333.］

Liu ZW, Han ZJ, Wang MC. 2002. The roles of carboxylesterase and acetylcholinesterase insensitivity in development of methamidophos resistance in *Nilaparvata lugens*［J］. *Chinese Journal of Pesticide Science*, **4**（4）：51-55.［刘泽文，韩召军，王荫长. 2002. 羧酸酯酶和乙酰胆酯酶在褐飞虱对甲胺磷抗性发展中的作用. 农药学学报，**4**（4）：51-55.］

Moores GD. 1982. A carboxylesterase with broad specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids（*Myzus persicae*）［J］. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **18**: 235-246.

Tang ZH. 1993. Insect Resistance and Management［M］. Beijing: China Agriculture Press. 221.［唐振华. 1993. 昆虫抗药性及其治理. 北京：农业出版社. 221.］

Xie YJ, Feng GL, He FQ. 2002. Research on the insensitiviyty of insecticide on different host of cotton aphid［J］. *Acta Phytophylacica Sinica*, **29**（2）：163-167.［谢燕佳，冯国蕾，何凤琴. 2002. 不同寄主植物棉蚜酯酶对杀虫剂不敏感性的频率分布. 植物保护学报，**29**（2）：163-167.］

Yang XQ, Gao XW, Zheng BZ. 2001. Comparison of the activity of the enzymes related to insecticide resistance in *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci*［J］. *Chinese Journal of Pesticide Science*, **3**（4）：38-43.［杨秀清，高希武，郑炳宗. 2001. 烟粉虱与温室白粉虱羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶和乙酰胆碱酯酶性质的比较研究. 农药学学报，**3**（4）：38-43.］